

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
"Dr. ISMAEL COSIO VILLEGAS"**

**ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLECULAS CD1 EN MONOCITOS DE  
PACIENTE CON TUBERCULOSIS PULMONAR**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**NEUMOLOGA.**

**PRESENTA:**

**DRA. KIMMY DULCELINA RAMIREZ VELASQUEZ**

**ASESOR:**

**DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA.  
INVESTIGADOR ADSCRITO DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION  
EN BIOQUIMICA.**

**COLABORADORES:**

**QC. LESLIE CHAVEZ GALAN  
ESTUDIANTE DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS UNAM.  
DRA. PATRICIA GOROCICA  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN BIOQUIMICA.**

**MEXICO, D. F. 2009.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

**DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**  
**TUTOR DE TESIS**  
**INVESTIGADOR ADSCRITO DEL DEPARTAMENTO DE**  
**INVESTIGACION EN BIOQUIMICA.**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**  
**“Dr. ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

---

**DR. JORGE SALAS HERNANDEZ**  
**JEFE DE ENSEÑANZA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**  
**“Dr. ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

<< Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México>>

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS:** por dirigir mi camino y permitirme contribuir con él en su ardua tarea de aliviar el dolor a un mundo necesitado.

**A mis padres:** por su lucha y esfuerzo para corregirme y guiarme por esta vida en especial a mi padre Roberto Ramírez por creer en mi.

**A mis hermanos:** por su amistad y cariño en especial a Ivancito por llenar nuestra vida de mucha alegría

**Adolfo Hernández:** por su comprensión y apoyo incondicional

**A la familia Mexicana en general:** por compartir momentos inolvidables

**A quienes colaboran con la realización de esta tesis:** Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, QC. Leslie Chávez Galán, Dra. Patricia Gorocicca, Pacientes y Residentes de Neumología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. ISMAEL COSIO VILLEGAS”

## INDICE

Indice	05
Resumen en español	06
Resumen en Ingles	07
Introducción	08
Justificación	15
Objetivo General	16
Material y Métodos	17
Resultados	23
Discusión y Análisis del problema	31
Conclusión	33
Anexos	34
Bibliografía	37

## RESUMEN

**Introducción.** La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa ocasionada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que afecta a un tercio de la población mundial. Durante la activación del sistema inmune se reconocen antígenos proteicos. En los últimos años, se ha observado que los antígenos lipídicos también son capaces de activar la respuesta inmune tanto en modelo animal como en estudios *in vitro* con células sanguíneas humanas. Estos antígenos lipídicos son procesados y presentados a través de las moléculas CD1. Sin embargo, se desconoce el porcentaje y densidad de expresión de estas moléculas en los pacientes **Objetivo.** Analizar la expresión de moléculas CD1 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. **Material y Métodos.** Se estudiaron 20 pacientes con TB pulmonar activa sin tratamiento antituberculosis y 20 individuos sin datos clínicos de tuberculosis (control). Las células monucleadas fueron aisladas a partir de sangre venosa mediante centrifugación en un gradiente de ficoll. Después de cuantificar y valorar la viabilidad celular, las células fueron incubadas con anticuerpos monoclonales contra CD14 y CD1a, CD1b y CD1d. Finalmente, las células fueron analizadas en un citómetro de flujo. **Resultados.** Observamos que la isoforma CD1b se expresa más en células de pacientes que en controles ( $4.7 \pm 3.0$  vs  $1.9 \pm 1.9$ , respectivamente) con diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0241$ ), mientras que no encontramos diferencias para las otras isoformas de la familia CD1. Consideramos que es importante continuar estudiando la respuesta inmune de pacientes con TB, en virtud de que cada día necesitamos más estrategias terapéuticas contra la enfermedad.

## ABSTRACT

**Introduction.** Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by a bacillus, *Mycobacterium tuberculosis*, which affects one third of the world population. During activation of the immune system recognize protein antigens. In recent years, it has been observed that the lipid antigens are also capable of activating the immune response in animal models and in vitro studies with human blood cells. These lipid antigens are processed and presented via CD1 molecules. However, unknown the percentage and density of expression of these molecules in patients. **Objective.** To analyze the expression of CD1 molecules on monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis. **Material and Methods.** We studied 20 patients with untreated active pulmonary TB and 20 individuals without clinical evidence of tuberculosis (control). Mononuclear cells were isolated from venous blood by centrifugation on a ficoll gradient. After quantifying and assessing cell viability, cells were incubated with monoclonal antibodies against CD14 and CD1a, CD1b and CD1d. Finally, cells were analyzed in a flow cytometer. **Results.** We note that the CD1b isoform was more expressed in cells of patients than in controls ( $4.7 \pm 3.0$  vs  $1.9 \pm 1.9$ , respectively) with statistically significant difference ( $p=0.0241$ ), while no differences were found for the other isoforms of the CD1 family. We believe it is important to continue studying the immune response of patients with TB, because every day we need more therapeutic strategies against disease.



## INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es uno de los mayores problemas de salud en el mundo, su agente etiológico es el bacilo intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (*MTb*), se calcula que una tercera parte de la población mundial está infectada por este bacilo (1). La organización mundial de la salud reportó en el año 2004 que hay de 8 a 10 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes anuales, se calcula que ocurren cerca de 5 muertes cada minuto como consecuencia de esta enfermedad (2).

La respuesta inmune que inicia el huésped durante la infección con *MTb* juega un papel fundamental para el desarrollo o control de la enfermedad (3).

Sabemos que la respuesta inmune del huésped en la mayoría de los casos logra controlar la infección de manera eficiente, ya que ~90 % de los sujetos infectados no desarrollan la enfermedad. Sin embargo, el sistema inmune tampoco tiene la capacidad de erradicar al bacilo debido a los diferentes mecanismos de evasión que ha desarrollado *MTb* para evadir la respuesta inmune (4), lo cual lleva al huésped a un riesgo latente de enfermar en algún momento de su vida; existe un aumento en las probabilidades de desarrollar TB por la presencia de enfermedades que alteran el sistema inmune, por ejemplo, diabetes mellitus o la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), enfermedades que son frecuentes en la población mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que el número de personas con diabetes en el mundo es de 171 millones y pronostica que aumentará a 366 millones en el año 2030. En México, desde 1940 la diabetes ya se encontraba dentro de las primeras 20 causas de mortalidad, con una tasa de 4.2 por 100 000 habitantes. Las consecuencias de la enfermedad crecieron a partir de 1970, cuando la

diabetes ocupó el 15º lugar como causa de muerte. Diez años después ocupó el noveno lugar y para 1990 alcanzó el cuarto lugar como causa de mortalidad general. A partir de 2000, la diabetes es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres (después de la cardiopatía isquémica, enfermedad resultante muchas veces de la diabetes). (5)

Aunado a la gran cantidad de factores de riesgo para desarrollar TB debemos mencionar que la vacuna de Calmette-Guérin (BCG), no es eficiente en la prevención de la TB adulta. Esta vacuna se fabrica con bacilos vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis*. Estudios realizados sobre su eficacia han sido contradictorios, se recomienda su uso sistémico en el recién nacido en países con alta o media endemia de TB. Sin embargo, ha sido probado que el impacto epidemiológico en comunidades vacunadas masivamente es prácticamente nulo, aunque si se admite que disminuye el desarrollo de formas graves de TB en la infancia, es por lo que se recomienda su uso no por su impacto sobre la epidemiología. (6)

Debido a la poca eficiencia de la vacuna BCG en los últimos años el campo de estudio en TB se ha impulsado principalmente en el desarrollo de vacunas (en la actualidad hay 9 vacunas propuestas, en 2009 iniciaron ensayos clínicos) y terapias más eficientes, para lograr este objetivo es necesario tener una mejor comprensión de la relación entre la respuesta inmune del huésped y el bacilo de la tuberculosis. (7)

Respuesta Inmune innata frente a *MTb*

Monocito/Macrófago:

Los monocitos se originan de medula ósea; proceden de la célula pluripotencial y gracias al factor de crecimiento GM – CSF (factor estimulante de colonias

formadoras de granulocitos y macrófagos) y otras citocinas como la IL- 3 logran su diferenciación a pro-monocito (8).

Los monocitos permanecen en la médula ósea menos de 24 horas, después pasan a circulación sanguínea y están en constante circulación, una vez que salen de los capilares sanguíneos y dirigen a los tejidos se transforman en macrófagos, su nombre procede del griego *macros* y *phagein* “gran comedor”. En tejido pulmonar reciben el nombre de macrófagos alveolares, los cuales desempeñan un papel esencial en la eliminación de las partículas que ingresan al pulmón, como es el caso del bacilo de *MTb*, se considera que los macrófagos alveolares son la principal célula fagocítica del bacilo y una de las primeras poblaciones celulares con las que interacciona. (9) El proceso de fagocitosis de *MTb* por el macrófago alveolar es un evento importante en la relación patógeno-huésped porque decide el resultado de la infección. El proceso inmunológico que se lleva a cabo entre la respuesta inmune y *MTb* puede resumirse de manera general en los siguientes puntos:

1. Interacción de *M. tuberculosis* a la superficie del macrófago
2. Fusión de fagosoma – lisosoma
3. Inhibición y/o muerte del crecimiento micobacteriano
4. Reclutamiento de células inmunes
5. Procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos T para el desarrollo de inmunidad adquirida (4)

#### Linfocitos T

Los principales mediadores de la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T y B. Las células B producen anticuerpos que pueden unirse a epítomos

estructurales, por otro lado las células T solo reconocen péptidos derivado de antígenos que son presentados a través de moléculas HLA clase I y II. (4)

#### Linfocitos TCD4+

Los linfocitos T que expresan el co-receptor CD4 (linfocitos T CD4+), son una población celular cuya función principal consiste en reconocer antígenos exógenos de origen proteico en el contexto de moléculas HLA-II (*Human Leucocyte Antigen class II*). Una vez que esta célula es activada su función efectora es la producción de IFN- $\gamma$  y otras citocinas, cuya finalidad es activar otras poblaciones celulares(10).

La patogénesis de infección por HIV ha demostrado que la pérdida de células T CD4+ incrementa la susceptibilidad de desarrollar TB aguda o reactivación (2, 4) Por lo tanto, las células T CD4 + son importante en la respuesta protectora y debe ser entendida como correlativa de inmunidad, y como objetivo en diseñar la vacuna.

#### Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T que expresan el co-receptor CD8 + (Linfocitos T CD8+), al igual que los Linfocitos T CD4+ reconocen antígenos de origen proteico pero de origen endógeno, el reconocimiento del antígeno esta restringido a las moléculas presentadoras de antígeno HLA-I (*Human Leucocyte Antigen class I*). Su principal función es lisar células infectadas por la vía dependiente de la liberación de gránulos y por vía Fas/FasL (4). También se ha descrito que esta población celular tiene la capacidad de secretar citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 y, así pueden desempeñar un papel en la regulación del equilibrio de las células Th1 y Th2 en los pulmones de pacientes con tuberculosis pulmonar (4). En el

campo de estudio de TB aún no se ha esclarecido totalmente, el mecanismo por el cual las proteínas del bacilo tienen acceso a las moléculas HLA-I (11).

## CD1

De manera más recientemente a la vía de presentación por HLA se ha descrito una vía diferente para el procesamiento y presentación de antígenos cuyo origen sea lipídico y no peptídico (11). En el estudio de *MTb* es relevante esta vía ya que su pared celular es rica en antígenos lipídicos, por ejemplo, ácidos micólicos y lipoarabinomanana (LAM) (13).

La vía de procesamiento de antígenos glicolipídicos ocurre a través de la familia de moléculas denominada CD1(13). Las moléculas CD1 son proteínas glicosiladas, estructuralmente parecidas a las moléculas HLA-I, con 3 dominios extracelulares  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , los cuales se asocian de manera no covalente con la  $\beta 2$  microglobulina, pero a diferencia del HLA-I tienen un polimorfismo limitado. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  forman una hendidura de unión para el antígeno que es más estrecha, profunda e hidrófoba, que la de HLA-I. Los antígenos presentados por CD1 son moléculas glicolipídicas que consisten en una cabeza hidrofílica con grupos polares y una cola hidrofóbica compuesta por una o dos cadenas hidrocarbonadas. (15)

En humanos la familia de moléculas CD1 está formada por 5 isoformas que se dividen en 2 grupos, el grupo 1 incluye las isoformas CD1a, CD1b y CD1c, el grupo 2 es CD1d, finalmente, la isoforma CD1e puede incluirse en el grupo 2 o algunos autores la consideran como un grupo aparte. (16)

CD1a se expresa en la superficie celular de células dendríticas derivadas de monocitos. Esta molécula sufre un proceso de reciclaje que lo lleva a compartimentos intracelulares, este proceso está mediado por clatrina, de esta

forma llega a endosomas tempranos, donde puede encontrar al antígeno lipídico que presentará. Se ha reportado que a través de esta molécula se presentan algunos lípidos propios como sulfátidos (17).

La isoforma CD1b también es expresada en células presentadoras de antígeno profesionales, principalmente en células dendríticas derivadas de monocitos. La isoforma CD1b puede encontrarse en compartimientos endosomales del complejo multivesicular denominado MIIC (MHC class II peptide-loading compartment por sus siglas en inglés), el cual está formado por extensas invaginaciones membranales y es abundante la presencia de moléculas clase II del sistema HLA (16).

Una vez que la molécula CD1b es sintetizada en el retículo endoplásmico se asocia a un glicolípido endógeno, posteriormente es transportada a la membrana celular. Al igual que CD1a por un proceso de reciclaje dependiente de clatrina es internalizada, su porción intracelular interactúa con la proteína adaptadora 2 (AP2), también interacciona con AP3 para poder ser transportada a endosomas tardíos, una vez ahí puede ser transportada nuevamente a la superficie celular o pasar por el complejo MIIC y de ahí trasladarse a la superficie celular. Muchas de las enzimas que potencialmente participan en el procesamiento de glicolípidos están localizadas en endosomas tardíos pero no en los tempranos, probablemente esta facilita el trabajo de procesamiento y presentación de antígenos en moléculas CD1b(16,17). A través de la molécula CD1b se presentan antígenos propios como los gangliósidos pero también existe amplia evidencia experimental que se relaciona a esta isoforma con lípidos de la pared celular de Mtb, por ejemplo, ácidos micólicos, glucosa monomicolato, y LAM. (17)

La isoforma CD1c también está en membrana celular, se localiza en compartimentos de la red endosomal junto con receptores de transferrina. Al igual que CD1b requiere de la interacción con AP2 para transportarse a endosomas tempranos y después de unirse a AP3, se transporta a endosomas tardíos. Se ha mostrado que la proteína CD1c es capaz de facilitar la presentación de fosfolípidos micobacterianos a linfocitos T autoreactivos (16).

CD1d también se internaliza por un mecanismo dependiente de clatrina e interactúa con la proteína AP3. Puede localizarse en endosomas tardíos y en los MIIC, se ha descrito que CD1d puede presentar otra vía de tráfico intracelular asociada a la molécula clase II en el humano, a través de la cual se integra como parte de la red endosomal. Presenta algunos lípidos propios como gangliósido GD3 y el lípido  $\alpha$ -galactosilceramida proveniente de *A. mauritianus* (11,16)

CD1e. Ha sido identificada solamente como una proteína intracelular y no ha sido asociada a presentación ó activación de linfocitos T. La vía de CD1 y la activación de células T NK hacia los antígenos glicolipídicos de *Mycobacterium tuberculosis*. (16,17)

Reconocimiento de antígenos micobacterianos por linfocitos T CD8+ restringidos a CD1

La subpoblación de linfocitos T que más ha sido estudiada por su asociación a las moléculas CD1 son los linfocitos T tipo NK; fenotípicamente, estos linfocitos pueden ser CD4+, CD8+, CD4-CD8- (dobles negativos) y TCR $\gamma\delta$  (18, 19, 20).

## **JUSTIFICACION**

Debido a lo notable de los antígenos lipídicos en la pared celular de la micobacteria es importante esclarecer el porcentaje y la densidad de expresión de moléculas de la familia CD1 y su contraparte HLA-I en los monocitos de pacientes con TB.

Esto nos permite entender mejor la respuesta inmune que se genera en los pacientes con tuberculosis.



## **OBJETIVO GENERAL.**

Análisis de la expresión de moléculas CD1a, CD1b, y CD1d en monocitos de pacientes con TB

## **MATERIAL Y METODOS.**

### **Es un estudio:**

Observacional.

Descriptivo.

Comparativo.

Transversal.

### **Definición de la población objetivo.**

Se incluirán 20 pacientes con tuberculosis pulmonar activa sin tratamiento anti tuberculosis que acudan al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de manera consecutiva y se compararan con un grupo control constituido por 20 sujetos sanos, definidos como individuos sin datos clínicos de tuberculosis, ni de otras co-morbilidades como diabetes o VIH.

En el periodo entre enero 2008 y marzo 2009.

### **Criterios de inclusión.**

- Pacientes mayores de 16 años de edad con tuberculosis pulmonar activa diagnosticada clínica, radiológica y microbiologicamente.
- Sin tratamiento anti-tuberculosis.
- Los controles serán individuos sanos definidos como individuos sin datos clínicos de tuberculosis, ni de otras co-morbilidades como diabetes o VIH.
- Que aceptaran participar en el protocolo y firmaran el consentimiento informado
- Ambos géneros

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes que estén recibiendo tratamiento con esteroides
- Pacientes con TB y otra comorbilidad

-Mujeres con TB y embarazo.

### **Aspectos éticos.**

El protocolo fue autorizado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias No: B32-08

Se anexa carta de consentimiento informado.

### **Tamaño de muestra.**

Es una muestra por conveniencia en la que se incluirán 20 pacientes con tuberculosis pulmonar activa y 20 controles sin tuberculosis ni co-morbilidades.

### **Obtención de células mononucleadas.**

A partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica, las células mononucleadas son separadas por centrifugación a 1,750 r.p.m. en un gradiente densidad de Ficoll-Hypaque (1.077 de densidad) durante 30 minutos a 18°C. Después de la centrifugación, se colectan las células de la interfase, se realizan de 2 a 3 lavados en solución salina fosfato pH 7.2 (PBS), posteriormente son cuantificadas en una cámara de Neubauer, las células se cuentan en los cuatro cuadrados grandes que están en cada esquina de la cámara, finalmente se hace una multiplicación que consiste en: el número total de células contadas (los 4 cuadrantes)/cuatro (las 4 cuadrantes contados) por 1ml (volumen en que se resuspendió la muestra) por 20 (dilución realizada de la células en suspensión) por 10,000 (Constante de la cámara de Neubauer), el resultado nos reporta el número de células por mililitro de solución.

$$Y/4 = Z * 1ml * 20 * 10,000 = X \text{ células/ml}$$

La viabilidad celular es valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripan en PBS a una concentración de 0.4%, todas aquellas células que tengan dañada su membrana permitirán el paso del colorante.

**Inmunofluorescencia directa:**

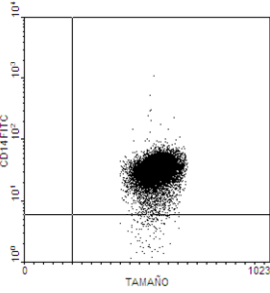
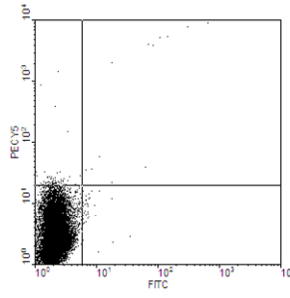
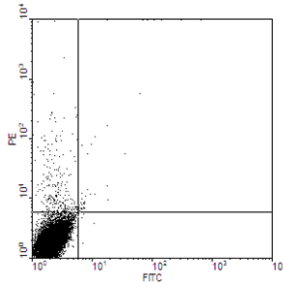
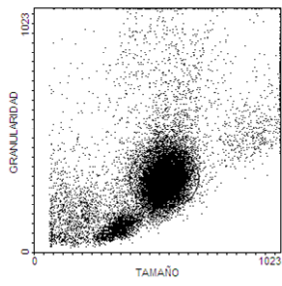
Para realizar la técnica de inmunofluorescencia partimos de una gama de anticuerpos monoclonales comerciales, la mayoría de ellos fueron de la empresa BD Pharmingen. Los anticuerpos utilizados ya estaban unidos a un fluorocromo, a continuación son enlistados: anti-CD14-PE, anti-CD14-FITC, anti-CD1b-FITC, anti-CD1a-PECy5, anti-CD1d-PE, anti-HLA-ABC-PECy5. También utilizamos anticuerpos denominados controles de isotipo, los cuales tienen el mismo fluorocromo y el mismo isotipo del anticuerpo monoclonal.

A partir del total de células mononucleadas (CMN) que tenemos en PBS se hacen alícuotas en tubo eppendorf para tener las células a una concentración de  $2 \times 10^5$  CMN en cada tubo. Centrifugamos las células a 1500 r.p.m durante 5 minutos, decantamos el sobrenadante y el “botón” celular queda en aproximadamente 50  $\mu$ l de PBS, se adiciona la concentración óptima de los anticuerpos (previamente estandarizada) que se puedan colocar en el mismo tubo o en tubo diferente si los anticuerpos llevan el mismo fluorocromo. Colocar las células durante 20 minutos en hielo para que la reacción de unión antígeno-anticuerpo se lleve a cabo. Posteriormente adicionar 300  $\mu$ l de PBS, centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m. Decantar nuevamente el sobrenadante, si en ese momento se van a leer las células, resuspender el “botón” celular en la solución FACSSlow (fluorescente-activated cell sorter) si se analizarán en el citómetro horas después se les adiciona 50 $\mu$ l de *p*-formaldehído al 1%.

**Análisis en el citómetro:**

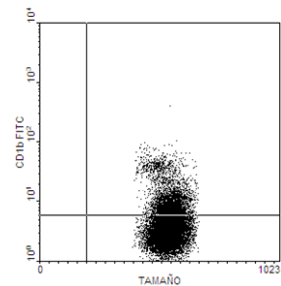
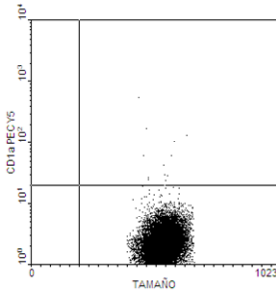
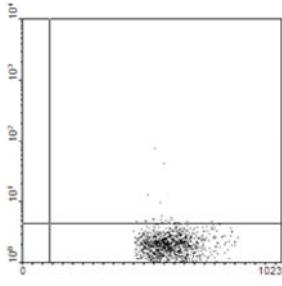
Cuando partimos de células fijadas en *p*-formaldehído al 1%, adicionar 300  $\mu$ l de PBS y resuspender, centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m, decantar sobrenadante y adicionar 300  $\mu$ l de solución FACSFlow para realizar la lectura en el citómetro. El equipo que utilizamos es un citómetro Becton Dickinson con software Cell Quest. Obtenemos 10,000 células que son graficadas primero en tamaño contra granularidad, en esta gráfica limitamos la región de interés, en nuestro caso la región de monocitos. La siguiente gráfica la hacemos con los controles de isotipo para verificar que los fluorocromos que estamos utilizando no nos dan falsos positivos o un fondo de fluorescencia que se considere como positivo. Posteriormente hacemos una gráfica donde marcamos tamaño celular *versus* CD14, con esta gráfica identificamos que al menos tengamos el 90% de monocitos (CD14+) porque será en esa región en donde vamos a evaluar la expresión de las moléculas presentadora de antígeno. Finalmente en esa región se analiza la expresión de la molécula de interés. Una vez que se obtiene la lectura en el citómetro los datos son analizados en el programa WinMDI para obtener los porcentajes de moléculas identificadas. A continuación se muestran las graficas realizadas tanto a pacientes como a controles.

## Paciente



Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
2 UR	552.4	31.1	21259	70.86	99.22
3 LL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
4 LR	525.2	3.5	168	0.56	0.78

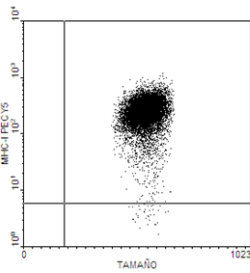
## Paciente



Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
2 UR	798.0	10.9	20	0.20	2.77
3 LL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
4 LR	759.2	2.9	701	7.01	97.23

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
2 UR	546.1	54.9	17	0.06	0.08
3 LL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
4 LR	562.1	2.3	21410	71.37	99.92

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
2 UR	553.0	11.3	5032	16.77	24.73
3 LL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
4 LR	550.4	2.9	15317	51.06	75.27



Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
2 UR	551.0	241.4	20301	67.67	99.76
3 LL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
4 LR	553.1	3.7	48	0.16	0.24

**Análisis Estadístico.** Para el análisis estadístico se utilizó el software STATA 9.0. Para la estadística descriptiva se utilizaron medianas y desviaciones estándar. La prueba de normalidad fue la de Shapiro-Wilk y de Kolmogorov. Se utilizó la U de Mann-Whitney para evaluar la significancia estadística de las diferencias observadas entre las isoformas de CD1. Se consideró como significativa una "p" menor a 0.05

## RESULTADOS

Se estudiaron 20 pacientes con tuberculosis pulmonar activa sin tratamiento antituberculosis y 20 controles sanos, definidos como individuos sin datos clínicos de tuberculosis, ni de otras comorbilidades como diabetes o VIH. En relación a la edad, los pacientes presentaron una media de 39.5 años con una desviación estándar de 20.3 años, los controles presentaron una media de 32.4 años con una desviación estándar de 6.4 años, con respecto al género se expresó como número y porcentaje habiendo un predominio del género masculino tanto en el primero como segundo grupo con 12 pacientes representando el 60%, y 14 controles representando el 70% lo que los hace grupos con características muy similares.

Todas las muestras sanguíneas se sometieron al proceso de obtención de células mononucleadas para luego realizar la técnica de inmunofluorescencia y el análisis en el citómetro y una vez obtenida la información, se graficaron los datos en el programa WinMDI para obtener los porcentajes de las moléculas identificadas y para verificar que nuestra técnica esta bien realizada se obtuvieron los porcentajes y densidades de HLA clase I.

La expresión de la isoforma CD1a en monocitos de pacientes fue de 1.5 de media  $\pm$  1.7 de desviación estándar, en controles una media de 0.9 y una desviación estándar de  $\pm$  0.7, con una p no significativa estadísticamente de 0.3401. La expresión de la isoforma CD1b en pacientes fue de 4.7 de media  $\pm$  3.0 de desviación estándar, en controles se obtuvo una media de 1.9  $\pm$  1.9 de desviación estándar con una p significativa estadísticamente de 0.0241. Nótese que es la única isoforma que tiene una p estadísticamente significativa. La



expresión de la isoforma CD1d en pacientes tuvo una media de 1.8 con una desviación estándar de  $\pm 1.8$ , en controles fue de 1.3 la media y de  $\pm 1$  la desviación estándar como podemos notar los valores son similares en uno u otro grupo lo que se refleja en el valor estadístico de la p de 0.8322. Por ultimo como se indicó en un párrafo previo para verificar que nuestra técnica esta bien realizada se obtuvo el porcentaje y la densidad de HLA-I en monocitos. El porcentaje de HLA-I en pacientes presentó una media de 91.5 con  $\pm 14.9$  de desviación estándar y en controles presentó una media de 89.05 con  $\pm 17.4$  de desviación estándar. La densidad de HLA-I en el grupo de pacientes presentó una media de 718.5 con una desviación estándar de  $\pm 546.3$  algo muy similar se observo en los controles con una media de 754.2 y una desviación estándar de  $\pm 541.1$  lo semejante se refleja en el valor de p que fue de 0.9030.

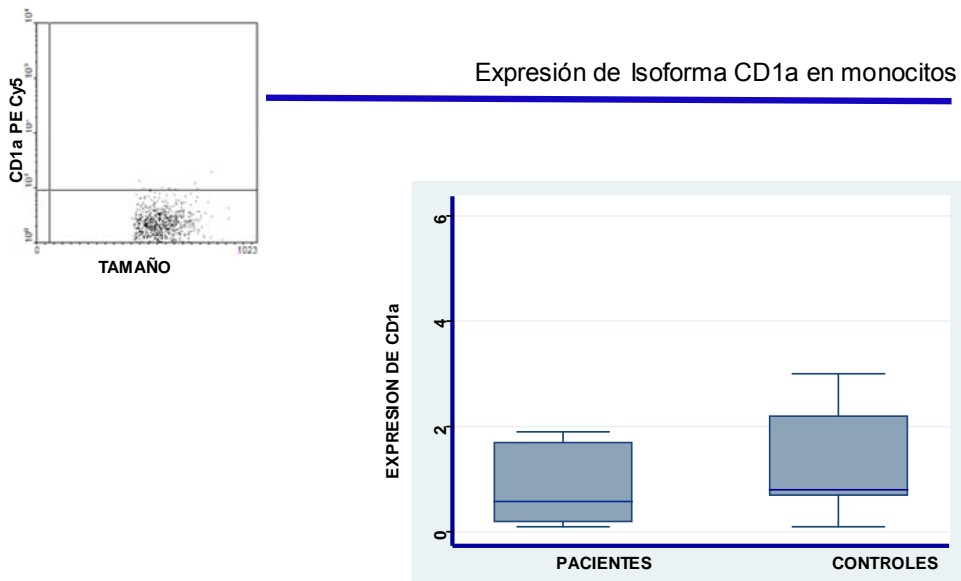
**Cuadro No.1**

**Análisis de la expresión de moléculas HLA-I y CD1 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar**

<b>Variable</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Controles</b>	<b>Valor de p</b>
Edad (años)	39.5 ±20.3	32.4 ±6.4	
Genero (mujeres/hombres)	8(40)/12(60)	6(30)/14(70)	
CD1a (porcentaje)	1.5 ± 1.7	0.9 ± 0.7	0.3401
CD1b (porcentaje)	4.7 ± 3.0	1.9 ± 1.9	0.0241
CD1d (porcentaje)	1.8 ±1.8	1.3 ± 1.0	0.8322
HLA-I (porcentaje)	91.5 ± 14.9	89.05 ± 17.4	0.9138
HLA-I (densidad)	718.5 ± 546.3	754.2 ± 541.1	0.9030

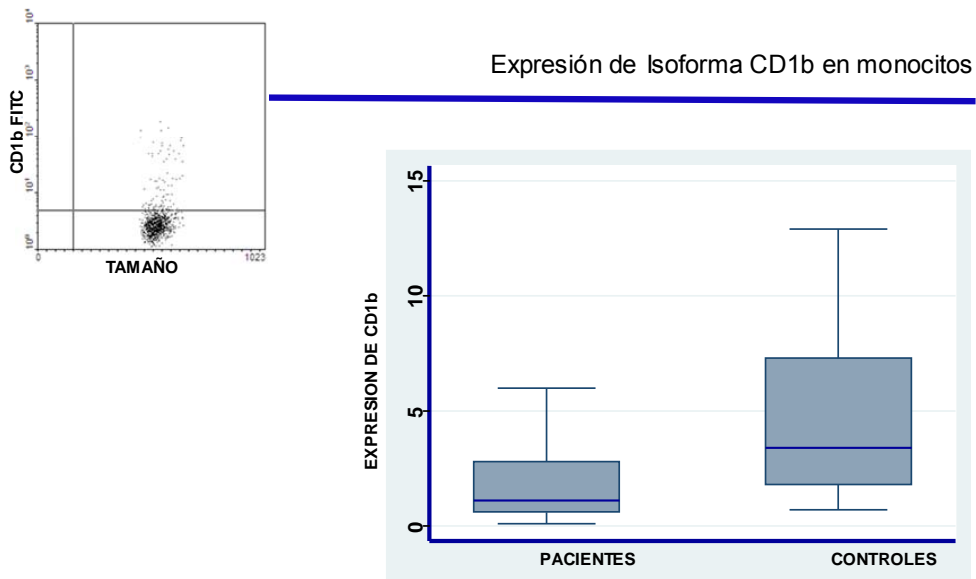
**Cuadro 1.** Muestra las diferencias entre pacientes versus controles y nótese que la expresión de la isoforma CD1b es mas expresada en pacientes que en controles con una p significativa. Los valores se expresan en media y desviación estándar, excepto en genero que se expresa en número y porcentaje.

**Figura 1**



**Figura 1.** En la parte superior izquierda se muestra la gráfica de tamaño celular contra expresión de CD1a. En la parte inferior derecha se muestra la grafica de percentiles intercuantiles donde observamos que los valores expresados en pacientes como en controles no hay diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.3401$ ).

**Figura 2**

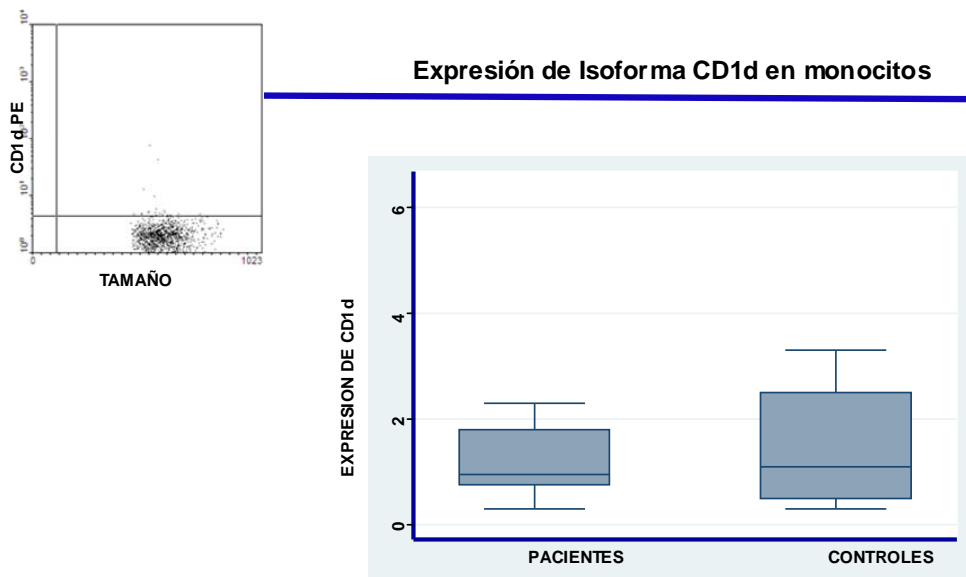


Gráficas: Percentiles intercuartiles  
n en ambos grupos: 20

PACIENTES media =  $4.7 \pm 3$   
CONTROLES media =  $1.9 \pm 1.9$   
 $p=0.0241$

**Figura 2.** En la parte superior izquierda se muestra la gráfica de tamaño contra expresión de la isoforma CD1b, el porcentaje expresado de dicha isoforma se muestra en la gráfica de percentiles intercuartiles. Nótese como la expresión es mayor en pacientes que en controles con una probabilidad estadísticamente significativa ( $p = 0.0241$ ).

**Figura 3**

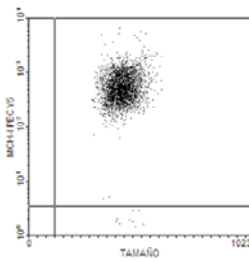


Gráficas: Percentiles intercuartilares  
n en ambos grupos: 20

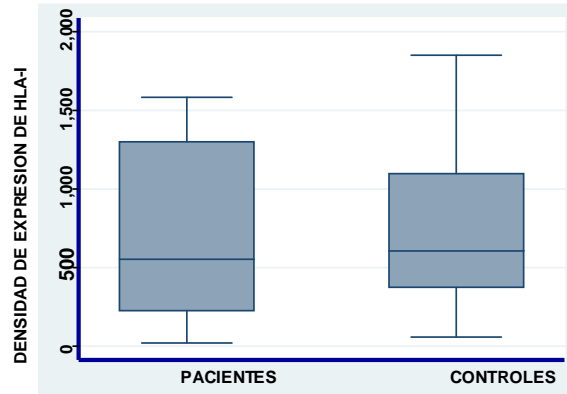
PACIENTES media= 1.8 ± 1.8  
CONTROLES media= 1.3 ± 1.0  
p=0.8322

**Figura 3:** En la gráfica superior izquierda se muestra el tamaño celular contra el porcentaje de expresión de la isoforma CD1d, mientras que en la parte derecha se muestra una gráfica de percentiles intercuartilares. Observamos que la expresión es similar en ambos grupos ( $p = 0.8322$ ).

**Figura 4**



**Porcentaje de expresión de HLA-1 en monocitos**

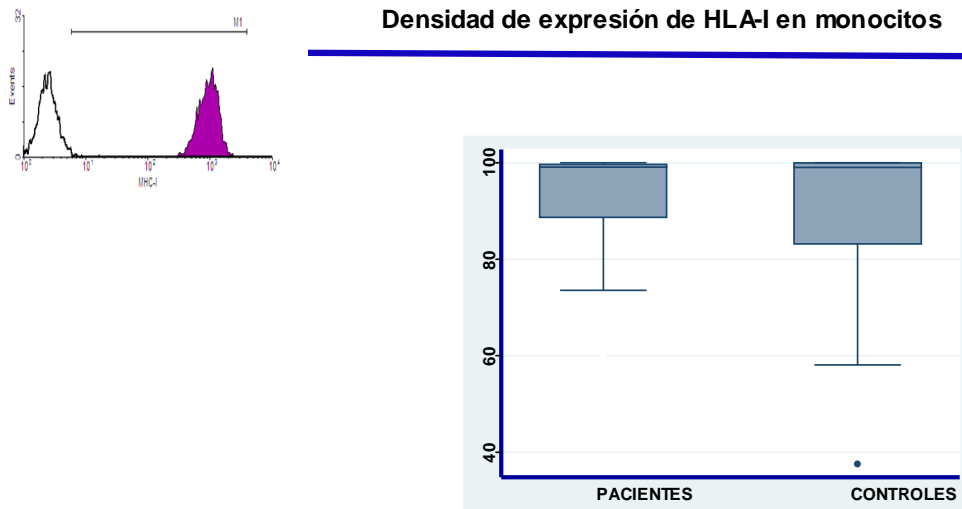


Gráficas: Percentiles intercuantiles  
n en ambos grupos: 20

PACIENTES media = 718.5 +/- 546.3  
CONTROLES media = 754.2 +/- 541.1  
p=0.9030

**Figura 4.** En la gráfica superior se muestra la expresión de HLA-I contra el tamaño celular. Como se mencionó, esto se llevó a cabo para comprobar que nuestra técnica estuvo bien realizada, lo cual se observó en la gráfica de percentiles intercuantiles que tanto en los monocitos de pacientes como en controles se expresa esta molécula, algo ampliamente demostrado.

**Figura 5**



Gráficas: Percentiles intercuantiles  
n en ambos grupos: 20

**PACIENTES** media = 91.5+/- 14.9  
**CONTROLES** media = 89.05 +/- 17.4  
p=0.9138

**Figura 5:** En la gráfica superior se muestra la densidad de expresión de HLA-I. Tanto pacientes como controles presentan una densidad importante de moléculas de histocompatibilidad de clase I en sus monocitos. Estos datos en conjunto representan un control de calidad que certifica que los fluorocromos que estamos utilizando no nos dan falsos positivos o un fondo de fluorescencia que se considere como positivo o que no se estén reaccionando adecuadamente contra las isoformas lo que pudiera alterar los resultados.

## DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

El descubrimiento de que las moléculas CD1 pueden presentar antígenos lipídicos derivados de la pared celular de las micobacterias a linfocitos T, sugiere que las CD1 juegan un papel importante en la inmunidad (11). Sin embargo, la documentación de que las isoformas de CD1 presentan antígenos lipídicos derivados de las micobacterias ha sido obtenida de estudios *in Vitro* (14). Y relacionado con esto, hay evidencia que las células dendríticas son los únicos vehículos periféricos que se sabe que son capaces de expresar todas las isoformas de la molécula CD1 (CD1a, CD1b, CD1c y CD1d) (14).

En el presente estudio en donde se investigó la expresión de las isoformas CD1a, CD1b y CD1d pero en monocitos de 20 pacientes con TB pulmonar y en monocitos de 20 individuos sanos. Encontramos que la expresión en porcentaje de la isoforma CD1a tanto en pacientes como en controles es pequeña sin presentar diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.3401$ ), lo que podría no ser beneficioso para el paciente si recordamos que esta puede inducir la producción de IL-12 y ser reconocida tempranamente por los linfocitos T CD8+. La isoforma CD1b se expresa significativamente más en pacientes que en controles, lo que podría hacernos suponer que a pesar del importante incremento en la expresión de esta isoforma en monocitos de pacientes infectados con *Mtb* esta vía de protección no ha sido suficiente para controlar la enfermedad o no sabemos si los pacientes quienes están respondiendo al tratamiento son los que están expresando más dicha isoforma por lo que consideramos sería interesante estudiar a pacientes respondedores a la



terapéutica como a pacientes no respondedores o a pacientes infectados con cepas multifarmaco resistentes.

El hecho de que las células NKT se activan en respuesta a la presentación de antígenos lipídicos que se produce a través de CD1d esta bien establecida (Ref). Sin embargo, solo recientemente se ha apreciado que bajos niveles de la expresión de CD1d en monocitos y células dendríticas son suficientes para activar las células NKT pero *in vitro*. Por lo que nos pareció importante analizar si los monocitos *ex vivo* tenían expresión de CD1d ya que mediante el estudio de modelos de ratón, se han visto implicadas a las células NKT y CD1d en la defensa contra una serie de agentes patógenos incluido *Mtb*. Recientemente, se observó que la administración de  $\alpha$ GalCer (un antígeno lipídico presentado a través de CD1d) a las células NKT podía reducir la carga bacteriana, reducir la lesión tisular y prolongar la supervivencia de los ratones inoculados con *M. tuberculosis* (19). Por otro lado, se observó que cuando se bloqueó la vía de presentación de CD1d, se derogó la producción de IFN- $\gamma$  (19). En el presente estudio observamos que la expresión en porcentaje de la isoforma CD1d tanto en pacientes como en individuos control fue pequeña sin diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.8322$ ). Consideramos que debemos ampliar y profundizar este tipo de estudios.

## **CONCLUSION**

Encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de CD1b que fue mayor en pacientes que en controles, lo cual nos indica que CD1b esta relacionada con la respuesta inmune del paciente hacia la TB y consideramos interesante continuar con mas estudios que investiguen si la expresión de esta isoforma es protectora o no para el paciente.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1. Carta de consentimiento informado.**

Fecha \_\_\_\_\_

#### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si Usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

#### **Título del Proyecto:**

Análisis de la Expresión de moléculas CD1 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar”.

#### **Responsable del proyecto:**

Ricardo Lascurain Ledesma, Departamento de Investigación en Bioquímica

#### **Propósito del estudio:**

En la tuberculosis es importante eliminar las células infectadas con gérmenes que causan la enfermedad, para esto se requiere que las células sanguíneas tengan en su superficie moléculas que activen el mecanismo de muerte celular. Nuestro propósito es investigar cuantas células de su sangre tienen en su superficie, un tipo de moléculas capaces de presentar fragmentos del microbio

causante de la tuberculosis. Esta información nos podría ayudar a comprender el proceso infeccioso.

**Beneficios del estudio:**

Este conocimiento junto con el obtenido de otros laboratorios del mundo, permitirá elaborar nuevos tratamientos médicos para reducir el número de personas infectadas.

**Procedimiento:**

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre sus hábitos y antecedentes médicos y a que se colecte 20 ml de sangre mediante una jeringa estéril desechable, conociendo que habrá una molestia breve por la punción venosa y en raras ocasiones un hematoma o moretón.

**Riesgos asociados con el estudio:** Este estudio consta de una sola fase que implica la toma de sangre. El riesgo del procedimiento es la formación del moretón debido a que en raras ocasiones se puede lastimar la vena. En estos casos la molestia puede durar dos a tres días. Cabe mencionar que en muy raras ocasiones pudiera presentarse inflamación de la vena después de la toma de sangre, en estos casos habrá vigilancia médica y si lo requiere se le administrarán medicamentos para disminuir la inflamación y se le indicará el procedimiento a seguir.

**Aclaraciones:**

No recibirá pago por su participación.

No tendrá que hacer gasto alguno para el estudio.

En el transcurso del estudio, Usted puede solicitar la información de su análisis al investigador responsable.

La información obtenida de este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad, en ningún caso se revelará su identidad.

**Derecho a rehusar:** Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria y es libre de rehusar a tomar parte sin que esto afecte la calidad de su atención, es decir, que nadie se enojará, ni habrá represalias, ni perderá sus derechos.

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

MEDICO RESPONSABLE

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

En caso de tener alguna molestia por la toma de sangre

Tel: \_\_\_\_\_

TESTIGO

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

TESTIGO

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

El Dr. Ricardo Lascurain podrá responder a cualquier pregunta sobre este proyecto Tels. 5487-1705 o 56-66-45-39 extensión 230.

## BIBLIOGRAFIA.

1. World Health Organization. *Tuberculosis*: Revised March 2006 Fact sheet No. 104.
2. World Health Organization *Treatment of Tuberculosis: Guidelines for national programmes* 2003. Third edition. pp 5 - 8; 11- 13
3. Edith NG Houben, Liem Nguyen and Jean Pieters *Interaction of pathogenic micobacterias with the host immune system* Curr Opin Microbiol. 2006 Feb;9(1):76-85.
4. Alamelu Raja *Immunology of tuberculosis* Indian J Med Res 120, October 2004, pp 213-232.
5. Gustavo Olaiz-Fernández, Rosalba Rojas, Carlos A Aguilar-Salinas, Juan Rauda, Salvador Villalpando, *Diabetes en adultos Mexicanos Salud pública de México* vol.49, suplemento 3 de 2007.
6. José A. Caminero Luna *Guía de la tuberculosis para médicos especialistas* 2003 pp 273 – 290.
7. Helen A. Fletcher, Tony Hawkrigde, Helen McShane *A New Vaccine for Tuberculosis: The Challenges of Development and Deployment* Bioethical Inquiry (2009) 6:219–228.
8. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman *Inmunología celular y molecular* 2004 5ta Edición
9. Palomino – Leão – Ritacco *Tuberculosis 2007* First Edition pp 157- 205
10. Andrea M. Cooper *Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis* Annual Review of Immunology. 2009.27:393-422
11. Peter A. Sieling, Jordi B. Torrelles, Steffen Stenger, Woosin Chung, Anne E. Burdick, Thomas H. Rea, Patrick J. Brennan, John T. Belisle, Steven A. Porcelli, and Robert L. Modlin *The Human CD1-Restricted T Cell Repertoire Is Limited to Cross-Reactive Antigens: Implications for Host Responses against Immunologically Related Pathogens* The Journal of Immunology, 2005, 174: 2637–2644.
12. David M. Lewinsohn, Jeff E. Grotzke, Amy S. Heinzl, LiQing Zhu, Pamela J. Ovendale, Mark Johnson and Mark R. Alderson *Secreted proteins from Mycobacterium tuberculosis Gain access to the Cytosolic MHC class-I antigen-processing pathway* The Journal of Immunology, 2006, 177:437 – 442.
13. Manfred Brigl and Michael B. Brenner *CD1: Antigen Presentation and T Cell Function* Annual Review Immunology. 2004.22:817-890.

14. Carme Roura-Mir, Lisheng Wang, Tan-Yun Cheng, Isamu Marsunaga, Christopher C. Dascher, Stanford L. Peng, Matthew J. Fenton, Carsten Kirschning, and D. Branch Moody *Mycobacterium tuberculosis* Regulates CD1 Antigen Presentation Pathways through TLR-2 The Journal of Immunology, 2005, 175: 1758 – 1766
15. Jenny E Gumperz and Michael B Brenner *CD1-specific T cells in microbial immunity* Current Opinion in Immunology 2001, 13:471–478
16. Gennaro De Libero and Lucia Mori *Recognition of lipid antigens by T cells* Nature Reviews/Immunology 2005 Volume 5
17. Isabel Sada-Ovalle, Luis Torre-Bouscoulet, María del Carmen Jiménez-Martínez, Salvador Martínez-Cairo, Edgar Zenteno, Ricardo Lascurain *La vía de CD1 y la activación de células T NK hacia los antígenos glicolipídicos de Mycobacterium tuberculosis.* Gac Méd Méx Vol.141 No. 1, 2005
18. Jennifer L. Gansert, Viviane Kieβler, Matthias Engele, Frederick Wittke Martin Rollinghoff, Alan M. Krensky, Steven A. Porcelli, Robert L. Modlin and Steffen Stenger *Human NKT Cells Express Granulysin and Exhibit Antimycobacterial Activity.* The Journal of Immunology, 2003, 170: 3154–3161.
19. Alissa Chackerian, Jen Alt, Vaji Perera, and Samuel M. Behar *Activation of NKT Cells Protects Mice from Tuberculosis.* Infection and Immunity, Nov. 2002, p. 6302–6309
20. A. Giuliani, L. Tentori, R. Pepponi, S.A. Porcelli, A. Aquino, L. Orlando, M. Sugita, M.B. Brenner, E. Bonmassar and G. Graziani *Cytokine-induced expression of CD1b molecules by peripheral blood monocytes: influence of 3'-azido- 3'-deoxythymidine* Pharmacological Research, Vol. 35, No. 2, 1997